

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



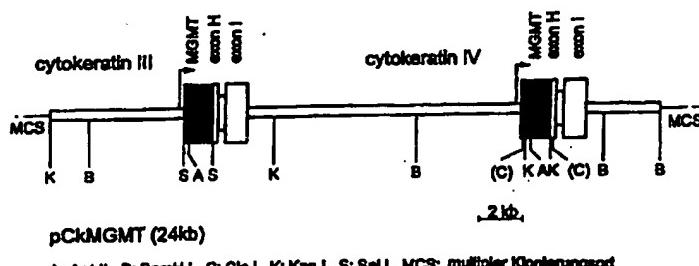
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/49802
C12N 15/00, A01K 67/027, C07K 14/47, C12N 9/10		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. Dezember 1997 (31.12.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01254		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 1997 (19.06.97)		
(30) Prioritätsdaten: 196 25 049.8 22. Juni 1996 (22.06.96) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN- FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BECKER, Klaus [DE/DE]; Selkeweg 4, D-06466 Gatersleben (DE). KAINA, Bernd [DE/DE]; Lettengasse 4, D-69493 Hirschberg (DE).		
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		

(54) Title: TRANSGENIC, NON-HUMAN MAMMAL CONTAINING AN ADDITIONAL DNA REPAIR GENE

(54) Bezeichnung: TRANSGENES, NICHT-MENSCHLICHES SÄUGETIER, DAS EIN ZUSÄTZLICHES DNA-REPARATURGEN
ENTHÄLT

(57) Abstract

A transgenic, non-human mammal (in particular a mouse) is disclosed, whose body and sexual cells contain an additional DNA repair gene parosexually transmitted to the original animal at the 1-8 cell stage of embryonal development. The invention finds applications in the medical field, in particular the prevention and therapy of malign diseases, and in the pharmaceutical industry. The object of the invention is to provide a transgenic animal suitable for carrying out detailed research on the significance of cellular defence mechanisms and specific DNA-damages during tumour formation. This should give a new impulsion to the prevention and therapy of malign diseases. For this purpose, a transgenic, non-human mammal is provided which contains an additional DNA repair gene coding for a function suitable for eliminating alkylated DNA lesions, the coded function being an O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), or for a function that corrects UV-induced damages. In a specially preferred embodiment of the invention, an additional recombinant repair gene is inserted which is expressed in the epidermis of the claimed mammal.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier (speziell eine Maus), dessen Körper- und Geschlechtszellen ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthalten, das dem Ursprungstier auf parosexuellem Wege im 1- bis 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung übertragen wurde. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, insbesondere die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen, und die pharmazeutische Industrie. Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein transgenes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Schutzmechanismen und spezifischer DNA-Schäden im Prozeß der Tumorentstehung durchzuführen. Damit sollen neue Impulse für die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen ermöglicht werden. Dieses Ziel wird gemäß der Erfindung mit einem transgenen, nicht-menschlichen Säugetier erreicht, welches ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthält, welches eine Funktion kodiert, die der Entfernung von alkylierten DNA-Läsionen dient, wobei die kodierte Funktion eine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist, oder die eine Korrektur von UV-induzierten Schäden bewerkstelligt. Eine besonders bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht darin, ein zusätzliches rekombinantes Reparaturgen einzufügen, das in der Epidermis des beanspruchten Säugetiers exprimiert wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	Sa. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, das ein
zusätzliches DNA-Reparaturgen enthält**

Beschreibung

5

Die Erfindung beschreibt ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier (speziell eine Maus), dessen Körper- und Geschlechtszellen ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthalten, das dem Ursprungstier auf parasexuellem Wege im 1- bis 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung übertragen wurde.

10

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, insbesondere die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen, und die pharmazeutische Industrie.

15

Transgene Tiere stellen für die biomedizinische Forschung sehr wertvolle Modelle dar, mit denen es gelingt, durch das Hinzufügen, Verstärken oder den experimentell erzeugten Ausfall von Genfunktionen die Rolle bestimmter zelleigener Faktoren bei ortho- oder pathogenetischen Prozessen *in vivo*, also im Gesamtorganismus aufzuklären. Insbesondere in der Krebs-forschung bieten transgene Tiermodelle die Möglichkeit, in Cancerogenese-Mechanismen experimentell einzugreifen. Die Krebsentstehung ist ein Mehrstufen-Prozeß, der mit der Initiation beginnt und sich über mehrere Stadien der Tumorpromotion und malignen Progression fortsetzt, bis ein klinisch diagnostizierbares Carcinom entstanden ist. Diesem Gesamtprozeß liegen verschiedene genetische und epigenetische Ereignisse zugrunde, die entweder spontan erfolgen oder durch chemische und physikalische Noxen induziert werden können; in jedem Falle handelt es sich um einen außerordentlich langwierigen Prozeß. Durch transgene Tiermodelle ist man in der Lage, bestimmte Ereignisse, die zur Generierung einer Krebserkrankung notwendig sind, experimentell zu verstärken bzw. die transgenen Tiere bereits mit Eigenschaften auszustatten, die sie entweder tumorresistenter oder tumoranfälliger machen, wobei sich in wesentlich kürzeren

Zeiträumen Neoplasmen entwickeln können. Derartige Modelle (z.B. US-Patent 4 736 866 der Harvard-Universität Transgenic non-human mammals") können eingesetzt werden, um carcinogen-verdächtige Substanzen (z. B. Arzneimittel) auf ihre krebsauslösende Wirkung zu untersuchen bzw. bestimmte Substanzklassen auf ihre eventuellen antineoplastischen Effekte zu untersuchen.

Es gibt bereits Tiermodelle, die zusätzlich Reparaturgene enthalten. (S.. Gerson et al., Mutat. Res. 307: 541-555, 1994). Die Reparaturgene dieser Modelle wirken jeweils nur in bestimmten Organen (Leber bzw. Thymus) und sind damit nur bedingt in der Lage, die einzelnen Schritte der Cancerogenese (Initiation, Promotion, Progression) einer experimentellen Analyse zugänglich zu machen.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein transgenes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist, detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Schutzmechanismen und spezifischer DNA-Schäden im Prozeß der Tumorentstehung durchzuführen. Damit sollen neue Impulse für die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen ermöglicht werden.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mit einem transgenen Tier gemäß den Ansprüchen 1 - 16 erreicht. Dieses Tier wird bevorzugt folgendermaßen erhalten:

Die Übertragung des Transgenes erfolgt vornehmlich im Stadium der Zygote, so daß das Transgen, nachdem es in das Ergut (Genom) des sich entwickelnden Organismus integriert wurde, in allen seinen somatischen und generativen Zellen gleichermaßen vorhanden ist. Das Vorhandensein des Transgenes in den Keimzellen des auf diesem Wege hergestellten transgenen Tieres hat zur Folge, daß auch die Nachkommen dieses Tieres das zusätzliche Gen im Genom aller ihrer Zellen enthalten.

Das für die Genübertragung verwendete DNA-Reparaturgen codiert ein Protein, das in der Lage ist, spezifische DNA-Primärschäden, die durch chemische oder physikalische Substanzen oder endogen in der Erbsubstanz (DNA) 5 hervorgerufen werden, effizient zu entfernen und somit die Integrität der Erbsubstanz wieder herzustellen. DNA-Primärläsionen, die nicht oder falsch repariert werden, können zu Mutationen führen, die wiederum Erbkrankheiten hervorrufen oder die Ursache für die Entstehung von Tumoren 10 sein können. Somit wird durch die Übertragung und Expression des zusätzlichen DNA-Reparaturgenes die Kapazität des betreffenden gentechnisch veränderten Säugetieres zur DNA-Schadenskorrektur erhöht und seine Tumor-Suszeptibilität verringert.

15 Die beanspruchten Tiere sind geeignete Modelle, die Bedeutung bestimmter DNA-Reparaturproteine als zelluläre Schutzmechanismen gegenüber der tumorinduzierenden Wirkung von exogenen und endogenen Noxen zu bestimmen. Eine signifikante 20 Reduktion von Mutationen bzw. Tumoren in den beschriebenen transgenen Tieren nach Behandlung mit mutagenen / cancerogenen Substanzen ist der entscheidende Beweis dafür, daß es sich bei dem in diesem Tier exprimierten transgenen DNA-Reparaturprotein um einen entscheidenden protektiven 25 Faktor des Säugers zur Verhinderung von Erbgutschäden bzw. Krebs handelt.

Da bestimmte DNA-Reparaturproteine zumeist nur ganz spezifische DNA-Primärschäden erkennen und reparieren, lassen 30 sich aus der verminderten Mutations-/Tumorinzidenz ebenfalls wichtige Rückschlüsse auf die zur Mutations-/Tumorauslösung entscheidenden DNA-Primärschäden ziehen.

35 Eine besonders bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht darin, ein zusätzliches rekombinantes Reparaturgen einzufügen, das in der Epidermis des beanspruchten Säugetiers exprimiert wird. Durch das Expressions-Targeting der

genannten DNA-Reparaturgene in der Haut der beanspruchten Tiere kann man durch die Anwendung des Mehrphasen-Hautcarcinogenese-Modells die Bedeutung bestimmter Typen von chemisch oder physikalisch induzierten DNA-Primärschäden und von zellulären Schutzfunktionen während der Tumorinitiation, Tumorkonversion und -promotion sowie der malignen Progression feststellen.

Diese Erkenntnisse sind von großer Bedeutung für die Ableitung möglicher präventiver und therapeutischer Maßnahmen bei verschiedenen Krebserkrankungen des Menschen.

Das Kreuzen der beschriebenen transgenen Säugetiere (vornehmlich Mäuse), die ein zusätzliches DNA-Reparaturgen exprimieren, mit anderen transgenen Säugetieren (vornehmlich Mäuse), die z.B. bestimmte Markergene als Mutationstarget enthalten und als in vivo-Mutationsdetektions-Modelle für die Genotoxizitätsprüfung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie verwendet werden, lässt Aussagen darüber zu, inwieweit ein solcher artifizieller Mutationsmarker im Genom eines Säugetieres der Prozessierung von DNA-Schäden durch die Zelle zugänglich und damit der Mutabilität des Säugergenoms vergleichbar ist.

Damit lässt sich das beanspruchte transgene Modell, bei dem die Expression eines zusätzlichen DNA-Reparaturgenes gezielt in bestimmten Geweben, beispielsweise der Haut, erfolgt, exzellent einsetzen zur Abschätzung der Bedeutung spezifischer DNA-Primärschäden für die Entstehung von bestimmten Tumortypen, die durch verschiedene chemische oder physikalische Noxen, beispielsweise UV-Strahlung, induziert werden können. Darüber hinaus erlaubt dieses beanspruchte transgene Modell, die Rolle von Proteinen, die in die Reparatur von DNA-Primärschäden involviert sind, bei der Prävention von malignen Entartungsprozessen zu charakterisieren.

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden

1. Herstellung des rekombinanten Transgenkonstrukttes pCkMGMT
5 (Abb. 1):

Der hautspezifische Expressionsvektor pCkMGMT wurde konstruiert durch das Einklonieren der cDNA-Sequenz des menschlichen O⁶Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens, die als 835 bp langes EcoRI-Fragment aus dem Vektor pKT 100 (Tano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 686-690, 1990) isoliert wurde, in das 22kb CkIII/IV*-Minilocus-Plasmid (Blessing et al., Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 15: 11-21, 1993), das den bovinen Cytokeratin 10 III- und Cytokeratin IV-Promoter sowie die entsprechenden Polyadenylierungssequenzen enthält. Mit Hilfe geigneter Adapter wurde jeweils eine MGMT-cDNA-Kopie in den unikalen SalI-Ort hinter den CkIII-Promoter und in den unikalen Clal-Ort hinter den CkIV-Promoter eingefügt. Die hierzu 15 angewandten gentechnischen Methoden sind beschrieben bei Maniatis et al., "Molecular Cloning, a Laboratory manual", 20 1989.

2. Herstellung der transgenen Mauslinie, die das rekombinante
25 CkMGMT-Reparaturgen enthält:

Das 22 kb SfiI-Fragment des Expressionsvektors pCkMGMT, das die menschliche MGMT-cDNA jeweils unter der Kontrolle des CkIII und des CkIV-Promoters enthält, wurde elektrophoretisch 30 separiert von der prokaryotischen Vektorsequenz, aus dem Gel eluiert, über QIAex (Quiagen, USA) gereinigt und zur Abtrennung von QIAex-Partikeln zentrifugiert. Das aufgereinigte Fragment wurde in einer Konzentration von 2.5 µg/ml TE in den leichter zugänglichen der beiden Pronuklei 35 der Zygote mikroinjiziert. Die Isolation der Zygoten, die Mikroinjektion und der Retransfer der manipulierten Zygoten in den Eileiter von Ammenmüttern wurden entsprechend den in

Hogan et al., (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1994) beschriebenen Methoden durchgeführt.

5 3. Identifizierung der CkMGMT-transgenen Tiere:

Im Alter von 4-6 Wochen wurde den aus der Mikroinjektion hervorgegangenen Tieren ein Stück der Schwanzspitze entnommen und aus diesem Bioptat hochmolekulare DNA nach der bei Hogan et al. (s. oben) beschriebenen Methode isoliert. Jeweils 1 µg der hochmolekularen Maus-DNA wurde verwendet, um mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR) das Transgen im Genom der Tiere nachzuweisen. Der verwendete 5'-Primer bindet an den Positionen -142 bis -117 des Cytokeratin III-Promoters, der 15 3'-Primer bindet an der menschlichen MGMT-cDNA (Positionen +727 bis +748), wodurch ein 890 bp Fragment amplifiziert wurde, das nach elektrophoretischer Separation per Southern Blot-Analyse detektiert wurde. Die Transgen-Integration in das Mausgenom wurde durch genomische Southern Blot-Analysen 20 unter Verwendung von 25µg DNA, die zuvor mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI, Sal I, Cla I, Kpn I und Aat II gespalten wurde, verifiziert. Als radioaktiv markierte DNA-Sonde diente in beiden Fällen das 835 bp Eco RI-Fragment der MGMTcDNA.

25 Die transgenen Tiere wurden mit nicht-transgenen Mäusen des gleichen Stammes verpaart und die Transmission des Transgenes mit den für die Identifizierung der Founder-Tiere beschriebenen Techniken geprüft. Die positiven G1-Nachkommen 30 wurden untereinander verpaart und die homozygoten Tiere mittels quantitativer Phosphor- Imaging- Analyse selektiert.

4. Charakterisierung der transgenen Mauslinie:

35 Zum Nachweis der gewebespezifischen Expression des Transgenes wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen und Geweben der transgenen Tiere nach der Guanidiniumthiocyanat/Phenol-

Methode (Chomczynski et al, Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987) extrahiert und mittels Oligo-dT-Cellulose aufgereinigt. Die so erhaltene Poly(A)⁺-RNA wurde in einem 1.4%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen 5 elektrophoretisch separiert. Das Transgen spezifische Transkript wurde durch Northern Blot-Analyse mittels einer 835 bp Probe der menschlichen MGMTcDNA nachgewiesen. Die Existenz des funktionsfähigen menschlichen MGMT-Reparaturproteins wurde wie folgt geprüft. Gewebeproben der transgenen Tiere wurden in Extraktionspuffer (20mM Tris-Cl, pH 8,5, 1mM EDTA, 1mM β -Mercaptoethanol, 10mg/ml Aprotinin, 10mM Bestatin, 10mM Leupeptin, 0,1mM PMSF) homogenisiert, einer Ultraschallbehandlung unterzogen und anschließend zentrifugiert. Jeweils 40 μ g der aus den Zellextrakten 10 isolierten Proteine wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Hilfe polyklonaler Kaninchen-Antikörper, die spezifisch die menschliche MGMT erkennen, detektiert. Zur Lokalisierung des transgenen MGMT-Proteins in den basalen und suprabasalen 15 Epidermiszellen und den Zellen der Haarfollikel wurden immunhistochemische Nachweistechniken unter Verwendung der obengenannten Antikörper benutzt. Die Aktivität des transgenen Reparaturproteins in den epidermalen Zellen wurde 20 durch den Transfer 3 H-markierter Methylgruppen von der O⁶-Position des Guanins 3 H-MNU-behandelter Kalbsthymus DNA 25 quantitativ bestimmt (Preuss et al., Int. J. Cancer, 61: 321-326, 1995).

Die transgene Mauslinie CkMGMT-Tg3 exprimierte das in ihr 30 Genom integrierte rekombinante DNA-Reparaturngen gewebespezifisch in der Haut, wobei das menschliche MGMT-Protein sich als biologisch aktiv erwies und in der interfollikulären Epidermis und den äußeren Zellen der Haarfollikel nachweisbar war.

5. Carcinogenese-Untersuchungen:

In Zweiphasen-Hautcarcinogenese-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die Expression des zusätzlichen rekombinanten DNA-Reparaturgenes in der Epidermis der beschriebenen transgenen Tiere die Suszeptibilität dieser Tiere gegenüber der hautcarcinogenen Wirkung bestimmter Substanzgruppen signifikant verringert. Im einzelnen wurde die Tumorinitiation durch eine einmalige dermale sub-threshold'-Dosis N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU), einer methylierenden N-Nitrosoverbindung, herbeigeführt. 1 Woche nach der Initiation wurde die Tumorpromotion durchgeführt, indem zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen der Phorbolester TPA topikal appliziert wurde. Im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren des gleichen Stammes war die Hauttumorzidenz bei den beschriebenen CkMGMT-transgenen Mäusen drastisch reduziert (Abb. 2). Wurde den CkMGMT-transgenen Tieren jedoch 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA), das andere cancerogene DNA-Schäden als O⁶-Alkylguanin induziert, als Initiator verabreicht und nachfolgend TPA topikal appliziert, so war die Häufigkeit von Hauttumoren bei beiden Gruppen von Tieren gleich. Dies zeigt, daß

15 - das O⁶-Methylguanin die wichtigste präcarcinogene DNA-Primärläsion bei der MNU-induzierten Hautcarcinogenese darstellt,

20 - das MGMT-Reparaturprotein den entscheidenden protektiven Mechanismus der Zelle zur Prävention von Mutationen, die durch Alkylantien induziert werden und Ursprung für die Entstehung von Tumoren sein können, darstellt,

25 - eine gewebespezifische Erhöhung des MGMT-Gehaltes, wie durch die hautspezifische Expression des zusätzlichen rekombinanten MGMT-Reparaturproteins in transgenen Mäusen gezeigt wurde, der Zelle einen effizienten Schutz gegenüber der tumorbildenden Wirkung alkylierender Substanzen verleiht,

30 - die Schutzfunktion auf der schadenspezifischen Reparatur von präcarcinogenen DNA-Läsionen beruht,

35

- die protektive Wirkung des MGMT-Proteines gegenüber der hautcarcinogenen Wirkung von Alkylantien auf der Prävention der Tumorinitiation beruht und nicht durch eine Beeinflussung von Mechanismen der Tumorpromotion oder durch eine generelle Beeinträchtigung der Tumorsuszeptibilität zustande gekommen ist.

Patentansprüche

1. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, dessen somatische und Keimzellen ein zusätzliches rekombinantes DNA-Reparaturgen enthalten, das dem genannten Säugetier oder seinen Vorfahren auf parosexuellem Wege im frühen embryonalen Stadium übertragen wurde.
2. Säugetier gemäß Anspruch 1, das ein rekombinantes DNA-Reparaturgen in seinem Genom an einem anderen chromosomalen Ort als die ebenfalls im Genom des genannten Säugetieres vorhandene endogene, zum genannten DNA-Reparaturgen homologe DNA-Sequenz integriert hat.
3. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen eine Funktion kodiert, die der Entfernung von alkylierten DNA-Läsionen dient.
4. Säugetier gemäß Anspruch 3, dessen transgenes DNA-Reparaturgen eine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) kodiert.
5. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen rekombinantes DNA-Reparaturgen eine Funktion kodiert, die die Korrektur von UV-induzierten DNA-Schäden bewerkstellt.
6. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Säugetier stammt.
7. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Nicht-Säuger stammt.
8. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Bakterium stammt.
9. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen synthetisiert worden ist.

10. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen genanntes rekombinantes DNA-Reparaturgen unter der transkriptionellen Kontrolle eines vom endogenen Promoter verschiedenen 5 Regulatorelementes steht.

11. Säugetier gemäß Anspruch 10, dessen genanntes rekombinantes DNA-Reparaturgen von einem gewebespezifisch regulierten Promoter kontrolliert wird.

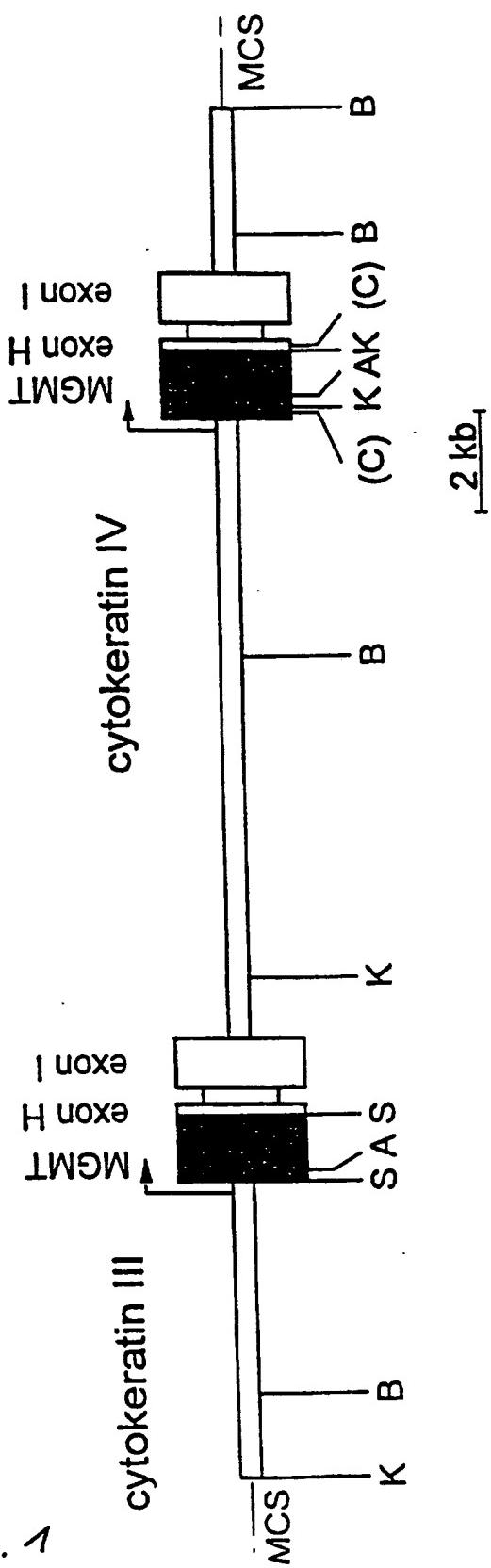
10
12. Säugetier gemäß Anspruch 10, wobei der genannte Promoter induzierbar ist.

15
13. Säugetier gemäß Anspruch 11, wobei der genannte Promoter ein Kontrollelement der Keratingenfamilie ist.

14. Säugetier gemäß Anspruch 11, dessen rekombinantes DNA-Reparaturgen in der Epidermis des genannten Säugetieres exprimiert wird.

20
15. Säugetier gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Säugetier ein Nagetier ist.

25
16. Säugetier gemäß Anspruch 15, wobei das genannte Säugetier eine Maus ist.



pCkMGMT (24kb)

A: Aat II, B: BamH I, C: Cla I, K: Kpn I, S: Sal I, MCS: multipler Klonierungsort

Abb. 1

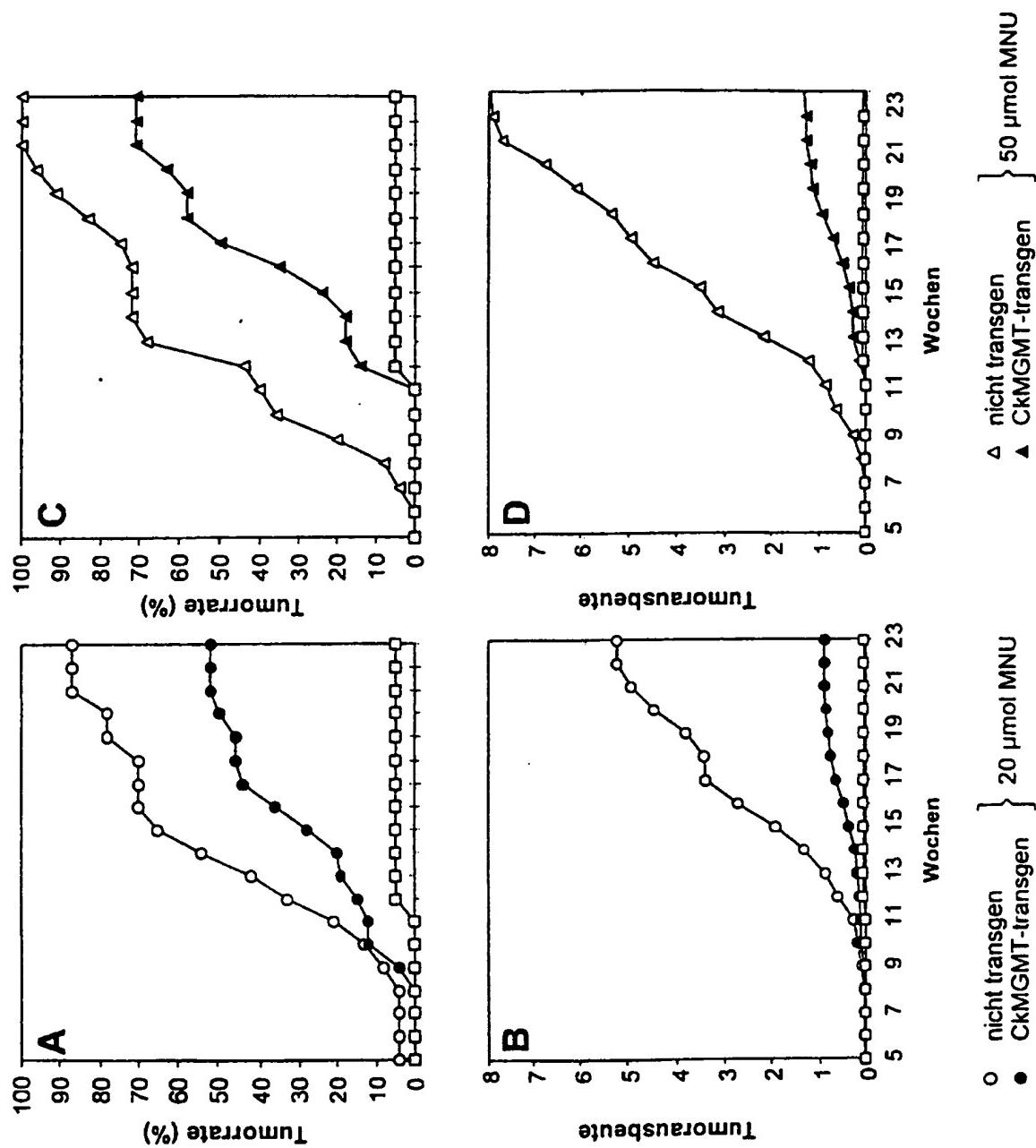


Abb. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. tel Application No
PCT/DE 97/01254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/00 A01K67/027 C07K14/47 C12N9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A01K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
0,X	<p>25th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Noorwijkerveld, NL, 18.-23. Juni 1995, XP002043441</p> <p>see abstract</p> <p>& BECKER, K. ET AL.: "Expression of a cytokeratin-promoter driven human MGMT repair gene in transgenic mouse" MUTATION RESEARCH, vol. 360, no. 3, 1996, pages 272-273, 7-3</p> <p>see abstract</p> <p>---</p>	1-6, 10-16
X	<p>& BECKER, K. ET AL.: "Expression of a cytokeratin-promoter driven human MGMT repair gene in transgenic mouse" MUTATION RESEARCH, vol. 360, no. 3, 1996, pages 272-273, 7-3</p> <p>see abstract</p> <p>---</p>	1-6, 10-16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

22 October 1997

31.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/DE 97/01254

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, L. ET AL.: "Differential sensitivity of human and mouse alkyltransferase to 06-benzylguanine using a transgenic model" CANCER RESEARCH., vol. 56, no. 8, 15 April 1996, MD US, pages 1880-1885, XP002043438 see the whole document	1-4,6, 9-11,15, 16
X	GERSON, S.L. ET AL.: "Alkyltransferase transgenic mice: probes of chemical carcinogenesis" MUTATION RESEARCH, vol. 307, no. 2, 1994, pages 541-555, XP002044222 cited in the application see the whole document	1-8, 10-12, 15,16
X	LIU, L. ET AL.: "Rapid repair of 06-methylguanine-DNA adducts protects transgenic mice from N-ethylnitrosourea-induced thymic lymphomas" CANCER RESEARCH., vol. 54, no. 17, 1 September 1994, MD US, pages 4648-4652, XP002043439 see the whole document	1-4,6, 9-11,15, 16
P,X	BECKER, K. ET AL.: "Targeted expression of human 06-methylguanine-DNA transferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis" CANCER RESEARCH., vol. 56, no. 14, 15 July 1996, MD US, pages 3244-3249, XP002043440 see the whole document	1-6, 10-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: das Aktenzeichen

PCT/DE 97/01254

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/00 A01K67/027 C07K14/47 C12N9/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A01K C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
0,X	25th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Noorwijkherhout, NL, 18.-23. Juni 1995, XP002043441 siehe Zusammenfassung	1-6, 10-16
X	& BECKER, K. ET AL.: "Expression of a cyokeratin-promoter driven human MGMT repair gene in transgenic mouse" MUTATION RESEARCH, Bd. 360, Nr. 3, 1996, Seiten 272-273, 7-3 siehe Zusammenfassung ---	1-6, 10-16

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderen bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweckmäßig erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfandenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfandenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abeendedatum des Internationalen Recherchenberichts
22.Oktober 1997	31.10.97
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentzaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Chambonnet, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inventar-Nr. des Aktenzeichen

PCT/DE 97/01254

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, sowie erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LIU, L. ET AL.: "Differential sensitivity of human and mouse alkyltransferase to 06-benzylguanine using a transgenic model" CANCER RESEARCH., Bd. 56, Nr. 8, 15.April 1996, MD US, Seiten 1880-1885, XP002043438 siehe das ganze Dokument ---	1-4,6, 9-11,15, 16
X	GERSON, S.L. ET AL.: "Alkyltransferase transgenic mice: probes of chemical carcinogenesis" MUTATION RESEARCH, Bd. 307, Nr. 2, 1994, Seiten 541-555, XP002044222 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-8, 10-12, 15,16
X	LIU, L. ET AL.: "Rapid repair of 06-methylguanine-DNA adducts protects transgenic mice from N-ethylnitrosurea-induced thymic lymphomas" CANCER RESEARCH., Bd. 54, Nr. 17, 1.September 1994, MD US, Seiten 4648-4652, XP002043439 siehe das ganze Dokument ---	1-4,6, 9-11,15, 16
P,X	BECKER, K. ET AL.: "Targeted expression of human 06-methylguanine-DNA transferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis" CANCER RESEARCH., Bd. 56, Nr. 14, 15.Juli 1996, MD US, Seiten 3244-3249, XP002043440 siehe das ganze Dokument -----	1-6, 10-16